

果実分析に関する研究

II. 果実形質の分析

(1) リンゴ果実の細胞数測定装置と2,3の適用

吉 名 孝

(山形大学農学部青果保蔵学研究室)

昭和43年8月31日受領

Studies on the Fruit Analysis

II. Analysis of Fruit Characteristics

(1) Apparatus for Counting Apple Cells Based on a Photoelectric Detection Method

Takashi TOMANA

(Laboratory of Postharvest Horticulture, Faculty of Agriculture, Yamagata University)

I. 緒 言

果実とくにリンゴ, ナシのような多肉果実においては, その内容の大半が果肉によつて占められており, 果肉組織はまた, これを構成する柔細胞の数と個々の大きさによつて容積が左右される. したがつて, これらの果実でその大きさを決定するものは主として果肉細胞の分裂増殖の程度と細胞自身の肥大のありかたである. 1個の果実の含む細胞数の多少は, 以上のように果実の大きさに支配的な影響を与えるだけではなく, 果実の品質面からみて, その保蔵力や, ある種の生理障害の発生に関連をもっていることが明らかである (MARTIN⁵⁾, SHARPLES⁶⁾).

このため, 果実の細胞数算定の方法が多く研究者によつて検討された. 従来の方法は大筋として顕微鏡下の観察, 測定によるものであるが, この方法で充分再現性のある数値を得るためには多数の細胞を検鏡測定する必要がある, 異常な労力と長時間を要するはずである.

LETHAMらは, リンゴなどの果実で組織をペクチナーゼや Ethylene diamine-tetra-acetic acid (EDTA) で個々の細胞に分離することにより, この細胞数を算えて1果実の含む全細胞数を推定する方法を考えた³⁾⁴⁾. さらに, この溶液中に浮遊する細胞を直接数えるため CORNWALL らは, 顕微鏡下で細管中に染色された細胞を流してこれによつて遮られた光を光電管に受け, このために生じたパルスを計数する装置を作成している¹⁾. この装置の利点は, 光電管とカウンターの性能によつて焦点位置で1秒間に最大2000個の細胞の流れるのを捕捉しうることにある. このため, リンゴ成熟果で約1gの果肉を個々の細胞に分離したのち, 直接, 全細胞を数えるのに数分を要するに過ぎない.

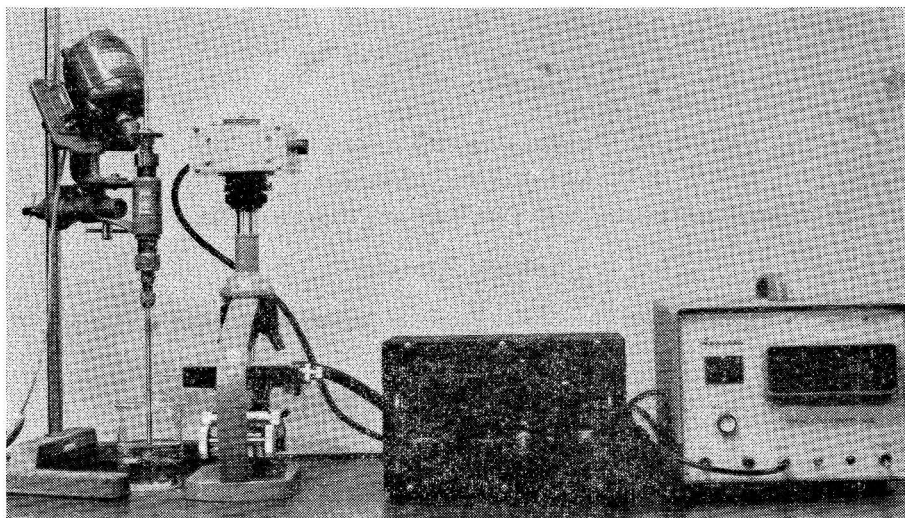
著者は LETHAM, CORNWALL らの方式にしたがい, その装置を改良してさらに安定した測定能力を得ようとした.

以下に述べるように, 著者の試作した本装置により基礎的な検討を行なつた結果, 信頼

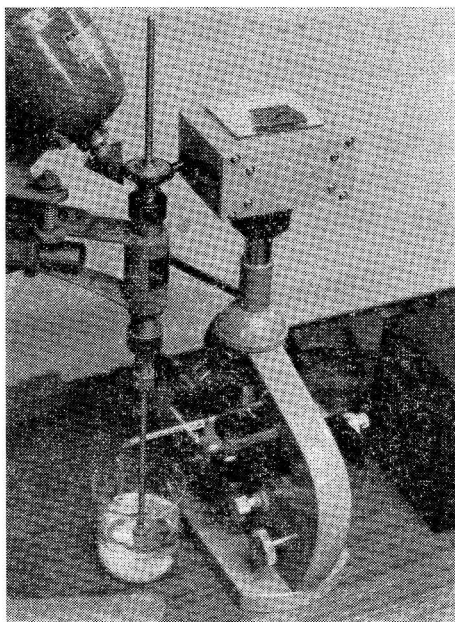
のできる数値を得たので、リンゴ紅玉樹の施肥試験によつて採取された果実および摘花果処理を実施した紅玉および祝果実について測定し、それぞれ対照区の果肉細胞数との比較を行なつた。

II. 装置の構成

測定装置は、第1図、第2図、第3図に示すように、受光部、増巾部、電源部、計数部

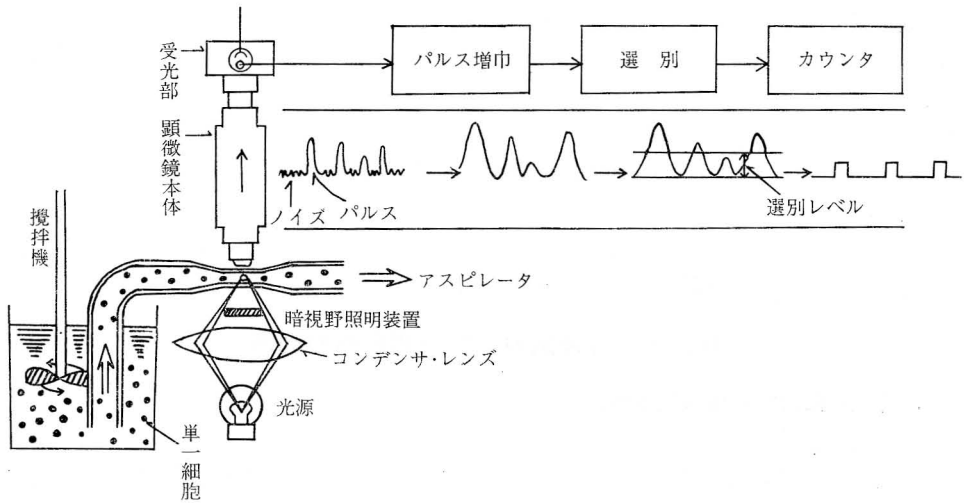


1. 装置の全体

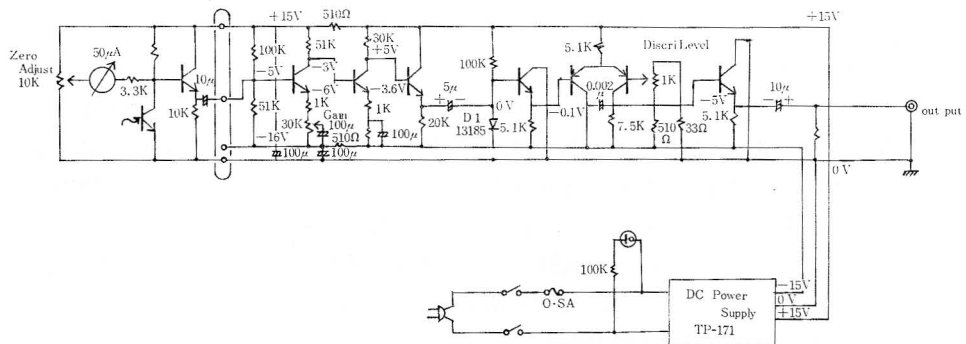


2. 受光部分

第1図 細胞数測定装置



第2図 測定装置模式図



第3図 受光・増巾・電源部分回路図

から成っている。

著者は、CORNWALL らの用いた明視野方式をやめて暗視野集光によつて単一細胞にあたる光をフォト・トランジスタに受けることとした。この結果、明視野法で要求された染色は不必要となり段取りが簡略化されただけではなく、暗視野照明においては細胞が視野内に存在した場合のみその散乱光がフォト・トランジスタに入射し、直射光は入って来ない。したがつて、光源のリツプルは出力信号に直接影響せず、直射光によらないため、フォト・トランジスタの疲労現象はみとめられず、時間の経過によつて感度が減少することはない。ただし、本来の感度自体は明視野にくらべて低いから両極間の電圧を高くする必要があり、このためフォト・トランジスタのノイズは大きくなることを免れない。一方暗視野方式をとると、明視野より感光の能力は落ちるから同じ条件下で明視野法のパルス数限界に対し計数速度も低下する。しかし上述の利点によつて、要求される時間の増加に堪えられ、さらに CORNWALL らの用いたフォト・トランジスタにくらべて高い感度のものを使用しているから、受光ないし計数精度の低下することはない。

浮遊状態で攪拌されている細胞はアスピレータで吸引されてガラスの細管を通って流れ、顕微鏡の接眼部直下に達する。このとき細胞光学像はフォト・トランジスタ (PD 31) で受けられ電気信号に変換される。プリアンプ (GAIN 1 倍) の出力点での電気信号の大きさは使用した計数装置 (KC-8212: 岩崎電機製) に入れるためには不十分であり、このため電源部で増巾 (GAIN 40~1000, 周波数範囲 40~4000 c/s) された後整形される (選別感度 0.15 V および 0.15 mV~4 mV)。

カウンタは電子式 3 桁, 電磁式 5 桁, 計 8 桁で計数速度は 1 c/s~20 K c/s であり計数分解能は入力パルス間隔 15 μ sec 以上である。

III. リンゴ果実の細胞数測定への適用

1. 計測値に対する信頼度の検討

a) 実験材料および方法

山形大学農学部農場果樹園に栽植された16年生マルパ台のリンゴ紅玉樹に生育した果実を用いた。

果肉組織の分離は LETHAM の方法⁴⁾ により EDTA (0.05 M) を用いて行なった。この際、果肉組織の採取は果肉中央部をコルクボーラーで円筒状に打抜き、1 試料約 1 g を供試した。

b) 実験結果

試料組織を分離して浮遊させた 100 cc のうち 2 cc を採り反復測定した平均値と、装置の受光部に撮影機を装着して細管中に流れて計数された細胞のすべてについて単一細胞と見做されるものの割合を調査した結果を第 1 表に示した。この結果から、一般的にリンゴ成熟果で細胞数測定を行なう場合、単一細胞の実数は計測値より概ね 5 % 少ないと考えてよいと判断された。また、同一試料について繰返し測定を行なつて誤差を調査したが、その値はいずれの場合も $\pm 3\%$ の範囲内にとどまつた。

2. 施肥の果実細胞数におよぼす影響

a) 実験材料および方法

既報⁷⁾ において窒素と磷酸の施肥試験を行なった紅玉10樹で生育した果実を用い、果肉組織はすべて固定したものを供試した。1 樹あたりの施肥量および時期を再録すれば第 2 表の通りであり I (N-0, P-2) 区 2 樹, II (N-1, P-1) 区 4 樹, III (N-2, P-0) 区 2 樹, IV (N-2, P-2) 区 2 樹とし、5 月15日より 9 月15日まで、毎月 1 回樹冠下全面にすき込んだ。

果実の採取は 9 月11日から10月21日までの間に約10日毎に各樹より10個体をとつた。

b) 実験結果

各処理区における果実重と果肉細胞数を

第 1 表 リンゴ紅玉果肉細胞数の実測値と測定装置による測定値との比較。

個体番号	実 測 値		平 均 測 定 値
	単 細 胞 数	組 織 片 そ の 他	
1	2,655	88	2,702
2	3,436	151	3,580
3	2,844	102	2,981
4	5,126	213	5,266
5	4,146	202	4,452
6	3,523	141	3,565
7	4,458	183	4,730
8	2,403	118	2,501
9	3,803	167	3,859
10	4,307	186	4,400

第2表 リンゴ紅玉樹施肥量 (1樹あたり kg)

処理区	硫 安			熔 成 燐 肥			塩 化 加 里		
	5月15日	6月15日～ 9月15日 (計4回)	全 量	5月15日	6月15日～ 9月15日 (計4回)	全 量	5月15日	6月15日～ 9月15日 (計4回)	全 量
I	0	0	0	1.0	0.2	1.8	1.0	0.2	1.8
Ⅱ	1.0	0.2	1.8	0.5	0.1	0.9	1.0	0.2	1.8
Ⅲ	2.0	0.5	4.0	0	0	0	1.0	0.2	1.8
Ⅳ	2.0	0.5	4.0	1.0	0.2	1.8	1.0	0.2	1.8

第3表 施肥処理区間における紅玉果実の果肉細胞数と果実重

処 理 区		I (N-0, P-2)		Ⅱ (N-1, P-1)				Ⅲ (N-2, P-0)		Ⅳ (N-2, P-2)	
樹 体		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9月11日	果 重 g	135	124	128	130	140	133	140	141	127	125
	細胞数 $\times 10^{-5}$	350	385	440	414	460	403	426	438	395	409
9月19日	果 重 g	145	127	149	153	152	153	180	164	145	145
	細胞数 $\times 10^{-5}$	380	395	422	403	445	388	408	405	414	415
10月1日	果 重 g	154	151	157	153	169	162	177	172	176	170
	細胞数 $\times 10^{-5}$	330	421	420	430	421	396	419	425	423	423
10月11日	果 重 g	164	150	181	178	169	182	196	187	181	173
	細胞数 $\times 10^{-5}$	391	408	437	401	437	410	430	410	431	440
10月21日	果 重 g	161	150	200	208	202	214	222	192	211	202
	細胞数 $\times 10^{-5}$	410	372	430	422	428	415	405	425	418	410

第3表に示した. 表の結果によると, 窒素無施用区を除き施肥区間で顕著な細胞数の差異はみられない. これは施肥開始時期が5月中旬であり, 細胞分裂へ強い影響をおよぼすと推定される期間を過ぎていたためではないかと考えられる. MARTINら, LETHAMの数年にわたる施肥試験の成績では, 各処理区間で細胞数の目立つた差異を観測している. これらの結果はまた, 実際に果実重の差として現われた果実肥大の施肥処理による変異が個々の細胞の肥大によつており, 細胞数の多少によつてもたらされたものではないことを示している.

3. 摘花果の果実細胞数におよぼす影響

a) 実験材料および方法

本学果樹園に栽植された20年生マルバ台リンゴ紅玉4樹, および祝4樹に生育した果実を用いた.

摘花果はそれぞれの樹で4方位の垂主枝を選び, 紅玉では5月7日から6月6日まで, 祝では5月5日から6月4日まで4回にわたり, 方位を異にして繰返されるよう1花叢1花 (もしくは1果叢1果) とする処理を行なつた.

各樹につき, はじめ1処理区に当たつた花もしくは果実は15個体であるが, 収穫時に測定に供することのできた果実数は1樹平均1処理区で約10個であつた.

祝では8月20日、紅玉では10月10日に果実を採取し、重量測定後直ちに果肉組織の分離処理を行なった。

b) 実験結果

摘花果処理各区の果肉細胞数は第4表に示す通りであった。

摘花処理によつて紅玉および祝のいずれの果実においても細胞数は多くなる。しかし、処理の時期が遅くなるにしたがつて差は少なくなり、6月の摘果ではほとんど差異をみとめなかつた。果実はいずれの処理においても無処理の対照果実にくらべ顕著な増大を示しており、この結果と細胞数の変異を対応させて考察すると、摘花果の時期を異にした果実相互間では同程度の重量をもつ場合でも内的な形質を異にしていることが重視される。事実 MARTIN らの報告によれば、リンゴでは細胞の多少とジヨナサン・スポットなどの生理障害発生度との間には高い関連性が存在するのであり、この意味でも、摘花果処理の果肉細胞数におよぼす影響に注目する必要があると考えられる。

第4表 摘花果処理によるリンゴ果肉細胞数の変異 ($\times 10^{-5}$)

品種	処理月日	樹 体 別			
		A	B	C	D
祝	5月5日	515	486	521	490
	5月15日	470	465	505	480
	5月25日	465	460	501	463
	6月4日	461	448	472	440
	対 照	450	452	480	445
紅玉	5月7日	490	493	480	444
	5月17日	479	480	450	410
	5月27日	462	440	425	410
	6月6日	460	435	430	401
	対 照	462	440	420	415

IV. 摘 要

1) リンゴなどの多肉果実において果実肥大に決定的な影響をおよぼす果肉細胞数の算定方法を確立するため CORNWALL らの方法を暗視野方式に改変して装置の試作を行なった。

2) 基礎的な検討の結果によると、本装置を用いた場合、再現性は充分であり、従来の方法に代り実用に供しうることがわかつた。

3) リンゴ紅玉果実で、施肥試験の結果を著者の方法によつて調査すると、窒素を施用しない区で細胞数が少なくなっているほか、燐酸を含めた各処理区間で顕著な変異をみとめなかつた。

4) リンゴ紅玉および祝樹で摘花果を時期別に行ない、成熟時に採取して果肉細胞数を比較すると、早期の摘花では両品種とも明瞭な差が観測され、処理区の細胞が多くなっていた。しかし、とくに祝果実では後期の摘果処理によつて細胞数の増加する現象はみとめられなかつた。

参 考 文 献

1. J. B. CORNWALL, R. M. DAVISON (1960): Rapid counter for small particles in suspension. Journal of Scientific Instruments. 37
2. B. Z. GINZBURG (1958): Evidence for a protein component in the middle lamella of plant tissue a possible site for indolylacetic acid action. Nature. 181
3. D. S. LETHAM (1958): Maceration of plant-tissues with Ethylen diamine-tetra-acetic acid. Nature. 181
4. — (1960): The separation of plant cells with Ethylenediaminetetraacetic acid. Experimental Cell Res. 21

5. D.MARTIN, T. L. LEWIS, J. CERNY (1964): Apple fruit cell numbers in relation to cropping alternation and certain treatments. Australian Journal of Agri. Res. 15. 6
6. R. O. SHARPLES (1964): The effects of fruit thinning on the development of Cox's Orange Pippin apples in relation to the incidence of storage disorders. Journal of Hort. Sci. 39. 3
7. 苦名 孝 (1959): リンゴ紅玉果実の生理的障害に関する研究 (第2報) 窒素施用量と果実の諸形質, 生理的障害との関係. 山形大学紀要 (農学) 3. 1

Summary

In studies of the growth and the storage quality of apple fruits the need arose for a rapid and accurate method of counting the number of cells present in the samples of tissue of known volume in order to estimate the average cell volume.

1) In this equipment, by the dark field illumination method, electrical pulses, amplified and used to trigger an electronic counter, are formed.

2) The cell number in Jonathan apple fruits from trees received different fertilizer treatments has been determined.

No-fertilizer fruit contained fewer cells than 2 NP, NP or N fertilizer fruits. Fruit from the latter three treatments showed no consistent differences in cell number.

3) Blossom thinning and fruit thinning increased cell numbers in Jonathan and American Summer Pearmain apple fruit. The greater effectiveness of blossom thinning may be due partly to the greater final intensity of thinning and partly to the reducing competition in the main cell division period.